

Enzymextraktion aus Zellen durch Ultraschall

Karl Hayduk

⁼
1963

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität
Frankfurt am Main

(Direktor: Prof. Dr. E. Heintz)

Enzymextraktion aus Zellen durch Ultraschall

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin

der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Karl Hayduk

aus Schluckenau

1960



Dekan: Prof. Dr. Krücke

Referent: Doz. Dr. H. J. Hübener

Korreferent: Prof. Dr. Wacker

Mündliche Prüfung: 15. 2. 1963

Disposition

A. Problemstellung

B. Allgemeine Vorbemerkung über Ultraschall

C I. Ergebnisse

1. Konzentrationsabhängigkeit
2. Spaltbreite
3. Temperaturänderungen
4. Beschallungszeit
5. Abgabe von Metallionen während der Beschallung
6. Weitere Verwendungsmöglichkeiten des Ultraschalles

II. Diskussion

D. Methodik

1. Zellzählung
 - a. Phasenkontrastmikroskopische Zellzählung
 - b. Photoelektronische Zellzählung
2. Optische Tests
 - a. Proteinbestimmung (Biuretmethode)
 - b. Optischer Test der Alkoholdehydrogenase
3. Beschreibung der Apparatur
4. Handhabung der Apparatur

E. Zusammenfassung

F. Literaturangaben

A. Bei der Extraktion von Enzymen und Proteinen aus verschiedenen Mikroorganismen erwies sich die Methode des Ultraschalls anderen Extraktionsverfahren überlegen. - Die Abhängigkeit des Zellaufschlusses von der Beschallungszeit sowie von der bei der Beschallung verwandten Frequenz und Leistung (1,2) war bereits in der Literatur beschrieben. Wir prüften, ob die Temperatur und die Zellkonzentration den Ultraschallaufschluß beeinflussen. Ferner wurde für das von uns benutzte Gerät untersucht, welchen Einfluß die Spaltbreite (Tiefe des Beschallungsraumes) auf den Aufschluß der Zellen hat, und ob Metallionen aus Beschallungsgefäß und -stempel in die beschallte Lösung austreten. Metallionen könnten schon in sehr geringer Konzentration die zu extrahierenden Enzyme vergiften.

B. Allgemeine Vorbemerkung über Ultraschall

Unter Ultraschall versteht man die Schallschwingung oberhalb der Hörgrenze des menschlichen Ohres, also Schallfrequenzen von rund 20 kHz an aufwärts. - Es gelingt heute, Frequenzen bis 10^6 kHz zu erreichen; für unsere Zwecke, d. h. für den Aufschluß von Zellen, erwiesen sich jedoch die Frequenzen an der Hörgrenze als am wirkungsvollsten (1). - Es ergibt sich sogleich die Frage, durch welche Kräfte der Ultraschall Zellmembranen und -strukturen zerreißt. Über die Theorien, die zu dieser Frage aufgestellt wurden, sei im folgenden referiert:

In der Hydrodynamik bezeichnet man das Auftreten von Hohlräumen und deren rasches Zusammenstürzen bei sehr hohen Zugspannungen als Kavitation. Die beim Zusammenstürzen der Hohlräume entstehenden Kräfte zerreißen dann die Zellmembranen und -strukturen. Die hierbei in einer kugelförmigen Gasblase auftretenden Kräfte lassen sich wie folgt berechnen (L. Rayleigh 5)

Eine Gasblase von der Ausgangsgröße B_0 (s. S. 5) mit dem Radius R_0 wird auf B mit dem Radius R verkleinert. Die Geschwindigkeit V der zusammenfallenden Flüssigkeitsteile ist umgekehrt proportional dem Quadrat des sich verkleinernden

Radius R,

$$\text{also } v = \frac{1}{R^2}$$

Beim plötzlichen Abbremsen der an die Gasblase grenzenden Flüssigkeitsteilchen wird die kinetische Energie dieser Teilchen teils in thermische, teils in Druckenergie umgewandelt. Der gesamte freiwerdende Druck vom Ausgangsradius (R_0) zum Endradius (R) beträgt

$$p = \frac{2 p_0}{3 \beta} \cdot \frac{R_0^3 - 1}{R^3}$$

wobei β die Kompressibilität der Flüssigkeit, p_0 im Normalfall 1 at. ist. Der Maximaldruck tritt in der Entfernung $r = 1,587 R$ vom Blasenmittelpunkt auf und beträgt

$$p = p_0 \cdot \frac{R_0^3}{\sqrt[4]{3} R^2}$$

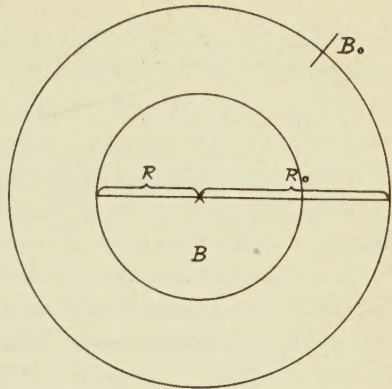


Abb. 1

Die Frage, durch welche Kräfte die Kavitation entsteht, schließt sich daran an. Hier müssen grundsätzlich 2 Fälle unterschieden werden: 1. Flüssigkeiten, die ein Gas enthalten, 2. solche, die gasfrei gemacht wurden. Bei Beschallung tritt im ersten Fall Pseudokavitation auf, während man im 2. Fall von echter Kavitation spricht. Die Kräfte, die zum Auftreten einer echten Kavitation nötig sind, müssen die Kohäsionskräfte des Lösungsmittels übersteigen. Genaue Zahlenwerte über die zur echten Kavitation notwendigen Kräfte sind noch nicht gefunden; die in der Literatur angegebenen experimentellen Werte streuen um etwa 2 Größenordnungen. Der errechnete Wert ist noch weit aus höher. Diese große Schwankungsbreite kann durch den Grad der Entgasung hervorgerufen sein. Vincent nimmt nämlich an, daß winzigste Bläschen von der Größenordnung $r = 10^{-5}$ cm als Kavitationskeime, sogenannte "Keimbläschen", Zentren darstellen, von denen aus die Flüssigkeiten zerreißen. Blake (26) weist auf kleinste Feststoffe hin, die

auch als Kavitationskeime dienen können. Andere Forscher nehmen an, daß von Orten erhöhter Temperatur (Mikrotemperatur) aus die Flüssigkeit zu zerreißen beginnt. Die Lösung vollständig gasfrei zu machen, d. h. die erwähnten Bläschen, die Kavitationskeime darstellen können, zu entfernen, ist methodisch äußerst schwer. Dies gelang jedoch Harvey mit Hilfe eines besonderen Verfahrens (6). Auf diese Weise keimblasenfrei gemachtes Wasser zeigt im Ultraschallfeld keine Kavitation mehr. Unter diesen Bedingungen tritt überhaupt keine echte Kavitation auf. Man dürfte daher streng genommen lediglich zwei Arten von Pseudokavitation unterscheiden. Der Satz "echte Kavitation tritt nur in völlig entgasten Flüssigkeiten auf (24)" ist damit nur begrenzt richtig. Wir wollen aber die bisherige Bezeichnung "Pseudokavitation" für die gashaltigen Flüssigkeiten und "echte Kavitation" für die mit herkömmlichen Mitteln entgasten Flüssigkeiten beibehalten. -

Für das Zerreißen von Mikroorganismen wird von den meisten Autoren die Kavitation verantwortlich gemacht. Schmidt und Uhlmeyer (3) sowie Johnsohn (4) kommen zu diesem Ergebnis, weil bei Erhöhung des äußeren Druckes, wodurch die Kavitation "unterdrückt" wird, die beschallten Mikroorganismen weniger zerstört werden. Sie nehmen an, daß die im Zellsaft gelösten Gase Kavitationskeime bilden, die zu Kavitationen innerhalb der Zellen und damit zum Zerreißen der Zellmembran führen. Diese Vorgänge wie auch die Gesetze von Rayleigh beschreiben Effekte, die durch die Pseudokavitation hervorgerufen werden. Hiermit ist aber nicht gesagt, daß Pseudokavitation und echte Kavitation nicht nebeneinander auftreten können. Möglicherweise reicht bei intensivster Beschallung nicht entgaster Flüssigkeiten die Pseudokavitation allein nicht aus, um der Zugkraft entgegen zu wirken, und es tritt daneben infolge der großen Beschallungsintensität noch echte Kavitation auf. Die Unterscheidung ist heute noch nicht sicher möglich, obgleich in der letzten Zeit der spektralen Verteilung der bei der Beschallung auftretenden akustischen Erscheinungen

große Bedeutung beigemessen wird. Hier könnte evtl. zwischen echter und Pseudokavitation unterschieden werden.

Ein weiteres wichtiges Problem ist die Abstrahlung von Ultraschallwellen aus dem Beschallungsgefäß an die Umgebung. Bei großer Durchlässigkeit des Beschallungsgefäßes müßte gegebenenfalls für Strahlenschutz gesorgt werden.

Die Reflexion einer Schallwelle an den Grenzen zweier Medien, deren Ausdehnung gegenüber der Wellenlänge des Schalles sehr groß ist, beträgt

$$R = \frac{V_1 \varrho_1 - V_2 \varrho_2}{V_1 \varrho_1 + V_2 \varrho_2} = \left(\frac{\frac{V_1 \varrho_1}{V_2 \varrho_2} - 1}{\frac{V_1 \varrho_1}{V_2 \varrho_2} + 1} \right)^2$$

wobei R das Reflexionsvermögen bezeichnet. Die Indices 1 und 2 beziehen sich auf die beiden Medien, $v \cdot \varrho$ ist der Wellenwiderstand, das Produkt aus Schallgeschwindigkeit und Dichte des betreffenden Stoffes. - Bei der von uns verwendeten Apparatur stellte die Metalledoppelwand nur eine dünne Platte zwischen der Flüssigkeit und der umgebenden Luft dar. Die Wandstärke dieser Metallplatte ist, verglichen mit der Wellenlänge des Ultraschalles, sehr klein; deshalb muß hier folgende Formel eingesetzt werden:

$$R_w = \frac{\left(\frac{V_1 \varrho_1}{V_2 \varrho_2} - \frac{V_2 \varrho_2}{V_1 \varrho_1} \right)^2}{4 \operatorname{ctg}^2 \frac{\lambda_w \pi d}{\lambda_w} + \left(\frac{V_1 \varrho_1}{V_2 \varrho_2} + \frac{V_2 \varrho_2}{V_1 \varrho_1} \right)^2}$$

wobei λ_w die Schallwellenlänge in der Metalledoppelwand und d deren Wandstärke bedeuten. Man erkennt leicht, daß bei einer Wanddicke von ganzzahligen Vielfachen der halben Wellenlänge ($\lambda/2, \lambda, 3/2\lambda$ usw.) die Reflexion gleich null, die Durchlässigkeit also 100 % ist. Bei unserer Versuchsanordnung beträgt die Wellenlänge etwa 20 cm, die Wandstärke 2 x 4 mm. Es wird daher praktisch alle Schallenergie an den Wänden der beiden Gefäßplatten reflektiert. Die angeführte Formel gilt nur für den senkrechten Einfall,

und in der Praxis treten immer noch sog. Scherwellen auf, die die Verhältnisse komplizieren. Grundsätzlich ändert sich jedoch nichts an den oben angeführten Überlegungen.

Weitere Theorien über die Ultraschallwirkung sind bei der Diskussion unserer Versuchsergebnisse angeführt.

Ergebnisse und Diskussion.

1. Konzentrationsabhängigkeit.

R. Davies (2) konnte einen geringfügigen Abfall der Zellzerstörung bei sehr hohen Konzentrationen feststellen, fand hierbei aber eine erhebliche größere Temperaturzunahme der beschallten Flüssigkeit als bei niedrigeren Konzentrationen. Versuche von Stumpf, Green und Smitz (12) an Bakterien ergaben bei hohen Konzentrationen eine sehr geringe Zerstörung der Bakterien. Diese Versuche wurden allerdings bei einer Frequenz von 600 kHz durchgeführt (vergl. 1). Ähnliche Ergebnisse fanden Harvey und Loomis bei Erythrozyten und Flagellaten.

Wir stellten uns besonders auch wegen der widersprechenden Angaben der Literatur die Frage, wie die Konzentration der Zellen den Zellaufschluß beeinflusst. Kriterium des Zellaufschlusses war für uns, wieviel Enzym und Protein durch Beschallen aus den Zellen austritt und nach Zentrifugieren im Überstand nachweisbar wird, ferner, wieviele Zellen durch den Ultraschall zerstört werden. Schließlich wurde noch mit einer elektronischen Zählmethode (EEL) die Größenverteilung der Zellengeprüft (18).^{*} In unseren ersten Versuchen wählten wir Konzentration von 2,5 bis 20 % Hefe. Hierbei wurden die Zellen unabhängig von der Konzentration prozentual gleich gut aufgeschlossen.

^{*}) Herrn Dr. Damminger sind wir für die Durchführung dieser Zählungen zu größtem Dank verpflichtet.

Versuchsreihe 12

Ver- such	Hefe- konzent- ration in %	aufgeschl. Zellen in %	Protein- gehalt in mg/ml	Prot. in %	Alko- holde- hydro- genase in μ M/min.ml	ADH in%	spez. Aktiv.
1	20	45,9	11,64	100	7,70	91,3	0,66
2	10	49,6	5,82	100	4,22	100	0,72
3	5	46,1	2,98	102	2,62	124	0,88
4	2,5	49	1,24	85	1,05	99,3	0,82

Anmerkung:

Bei diesen Versuchen wurde der Gehalt an Protein und Enzym bei 10 % Hefe (Versuch 2) gleich 100 % gesetzt, alle anderen Versuche auf diese 100%ige Lösung umgerechnet und dann der prozentuale Aufschluß angegeben.

Versuchsreihe 14

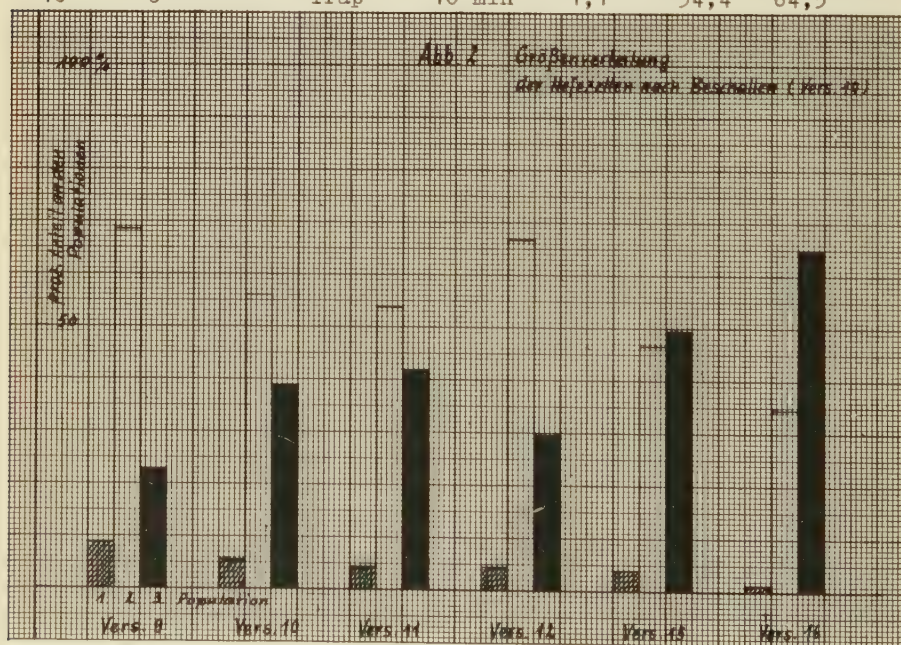
Ver- such	Hefe- konz. in %	Protein- gehalt in mg/ml	Prot. in %	ADH in μ M/min.ml	ADH in %	spez. Aktivität in μ m/min.mg Prot.
1	50	14,77	59,6	26,1	131,8	1,77
3	40	12,41	62,4	20,1	122,4	1,62
5	30	10,31	69,2	16,9	141	1,62
7	20	7,6	76,9	8,0	102,8	1,05
9	10	4,89	100	3,97	100	0,81

Bei sehr hohen Konzentrationen fällt die Anzahl der aufgeschlossenen Zellen relativ ab. Jedoch steigt die Enzymausbeute gering, die spez. Aktivität auf etwa das Doppelte an. Zur Zeit kann man jedoch für das präparative Arbeiten im Durchlauf höhere Konzentrationen als 30 g Presshefe ad 100 ml nicht verwenden, da geeignete Pumpsysteme für derart visköse Suspensionen nicht verfügbar sind. Vergleicht man die spezifische Aktivität der Versuchsreihen 12 und 14, so findet man, daß diese bei Konzentrationen von 10 und 20 % am niedrigsten ist.

Die Versuchsreihe 14 wurde nach der elektronischen Methode (EEL) ausgezählt. Die Größenverteilung der Hefezellsuspension sprach dafür, daß wir es nicht mit einer einheitlichen Hefepopulation zu tun haben, sondern drei in der Zellgröße unterschiedliche Populationen vorliegen. Diese wurden als große, mittlere und kleine Zellen bzw. 1., 2. und 3. Population bezeichnet.

Versuchsreihe 14

Versuch	Beschal- lungstemp. in C	Suspen- sionsme- dium	Zeit d. Beschal- lung	Zellzahlen in %		
				1. Pop.	2. Pop.	3. Pop.
9	0°	Trap	unbesch.	8,9	68,5	22,6
10	0°	Trap	3 min	5,2	56,0	38,8
11	-10°	10%Adeton 90%Trap	3 min	4,3	53,9	41,8
12	+20°	Trap	3 min	4,3	66,4	29,3
15	0°	Trap	5 min	4,0	46,5	49,5
16	0°	Trap	10 min	1,1	34,4	64,5



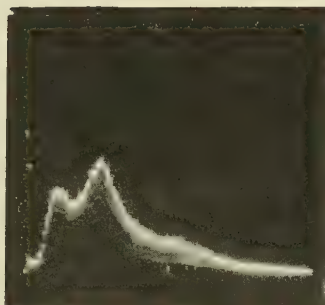


Abb. 3 Versuch 9

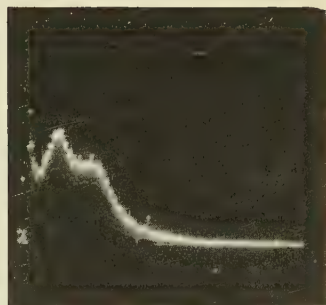


Abb. 4 Versuch 10

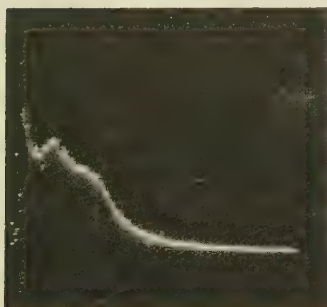


Abb. 5 Versuch 11

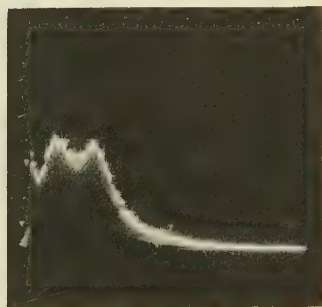


Abb. 6 Versuch 12

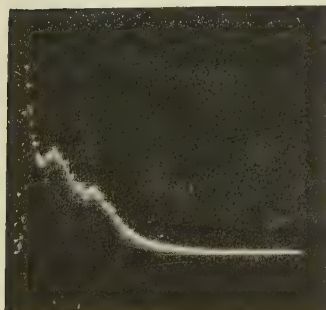


Abb. 7 Versuch 15

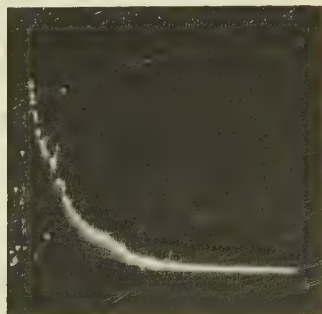


Abb. 8 Versuch 16

Nach Beschallen ergaben sich also beträchtliche Unterschiede in der procentualen Zusammensetzung der drei Populationen verglichen mit der unbeschallten Kontrolle. Die beiden Populationen mit den größten Zellen waren zugunsten der 3. Population vermindert. Die 3. Population nach Beschallen entsteht also durch Superposition der intakt gebliebenen Zellen der 3. Population durch die Zelltrümmer der gesamten Suspension, so daß man über den tatsächlichen Aufschluß der 3. Population nichts aussagen kann. - Vergleicht man die mit dem Phasenkontrastmikroskop gefundenen Zellzahlen mit denen der elektronischen Zellzählung, so zeigt sich, daß die unbeschallte Hefezellsuspension im EEL niedrigere Werte ergibt als im Phasenkontrastmikroskop. Dagegen war es für die beschallten Suspensionen umgekehrt. Die Diskrepanz läßt sich wahrscheinlich wie folgt aufklären: Im Phasenkontrastmikroskop werden Zellen, die durch das Beschallen ihre Zellinhaltsstoffe verloren haben und nur noch als Zellmembranen, als sog. "ghosts", vorliegen, und die größeren Zellbruchstücke nicht mitgezählt. Diese Bestandteile geben im EEL aber noch Impulse, wodurch die höheren Werte für beschallte Suspensionen im EEL zustande kommen. Dagegen wurden im EEL alle Zellen, die kleiner als 5 μ sind, nicht registriert, während sie im Phasenkontrastmikroskop mitgezählt werden mußten, da wir infolge der subjektiven Angaben keine genaue untere Grenze der mitgezählten Zellen festlegen konnten. In jedem Fall ist es wichtig, daß die Zellen bis zur Auszählung bei 0°C aufbewahrt werden müssen, da sonst eine Vermehrung der Hefezellen stattfindet, die die Ergebnisse verfälscht.

2. Abhängigkeit von der Spaltbreite.

R. Davies fand, daß Hefezellen mit zunehmender Tiefe (Spaltbreite) des Beschallungsraumes weniger aufgeschlossen werden. Auch Shropshire (15), Whitney und Russel (16), Reid (17) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Nur konnte durch diese Versuche nicht entschieden werden, ob tatsächlich die Tiefe oder

das Volumen der beschallten Suspension der entscheidende Faktor für die geringere Aufschließung war, da die beiden Größen bei den bisherigen Versuchsanordnungen nicht unabhängig voneinander verändert werden konnten. Wir konnten dieses mit Hilfe der von uns verwandten Ultraschallapparatur prüfen. Es wurden von uns Spaltbreiten von 2 bis 24 mm (Tiefe des Beschallungsraumes) darauf untersucht, wie sie den Ultraschallaufschluß beeinflussen.

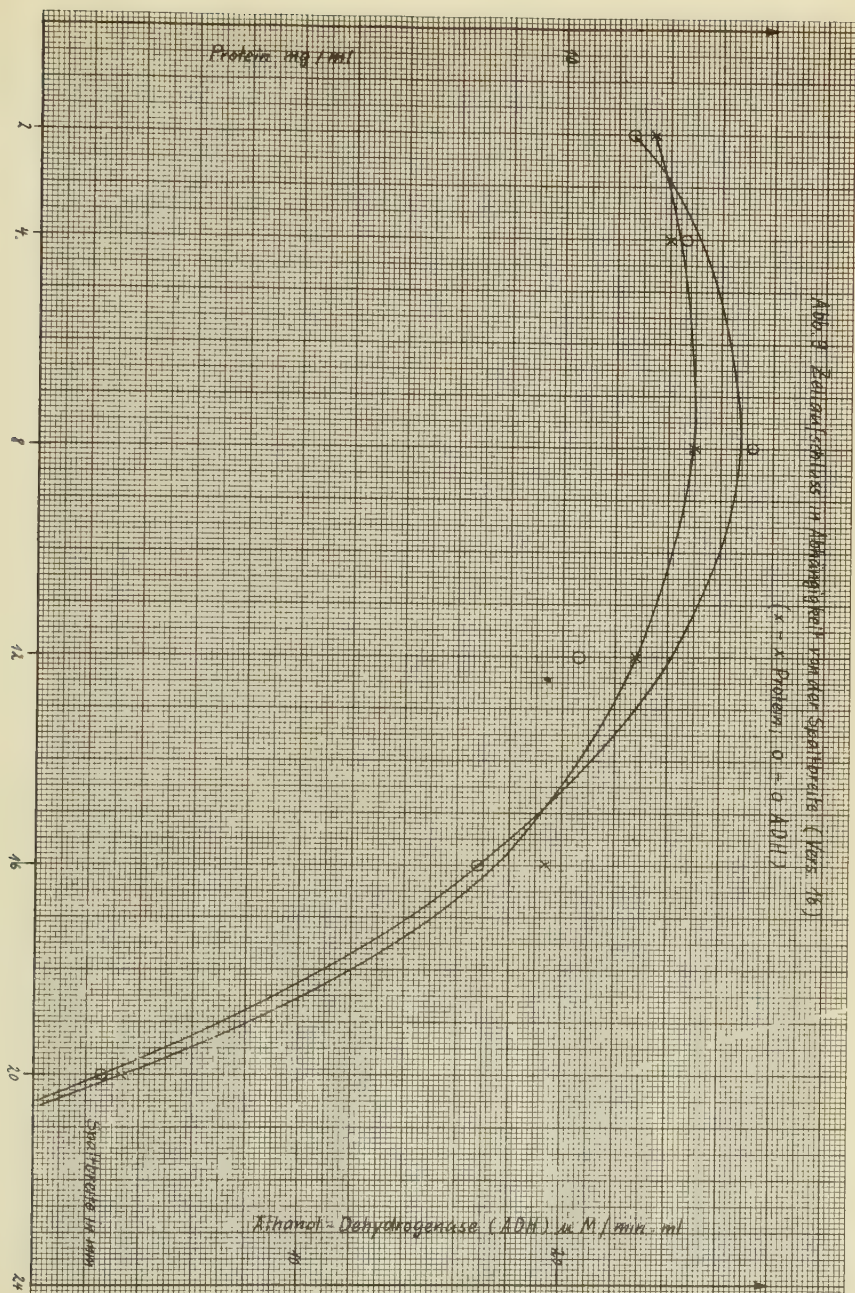
Versuchsreihe 16

Ver- such	Spaltbr. in mm	Protein- geh. mg/ml	Prot. in %	ADH in μ M/min.ml	ADH in %	spez. Aktiv. in μ M/min.mg Protein
1	2	11,7	93,8	22,7	84	1,97
2	4	12	96	24	88,4	2,00
3	8	12,5	100	27,1	100	2,17
4	12	11,35	90,8	20,6	76,5	1,84
5	16	9,68	77,0	16,8	62,1	1,63
6	20	1,68	13,4	2,67	9,5	1,54
7	24	keine meßbaren Werte				

Anmerkung:

Die Konzentration betrug 20 g Hefe ad 100 ml. Der optimale Wert bei 8 mm Spaltbreite wurde 100 % gesetzt, und danach die übrigen prozentualen Angaben berechnet. (s. graphische Darstellung auf S. 14)

Es ergab sich also bei einer Spaltbreite von 8 mm die höchste Ausbeute an Protein und Enzym sowie die höchste spez. Aktivität. Bei großen Spaltbreiten fehlte der Aufschluß fast völlig, und das Kavitationsgeräusch veränderte sich deutlich zu höheren Frequenzen. Die Tiefe des Beschallungsgefäßes beeinflusst den Zellaufschluß daher sehr deutlich.



3. Temperaturabhängigkeit des Ultraschallaufschlusses.

Viele Autoren, unter anderem Davies (2), haben die Temperaturerhöhung bei Beschallung erwähnt und Apparaturen angegeben, um die Erwärmung zu vermeiden. Wie der Zellaufschluß von der Temperatur abhängt, wurde bisher noch nicht systematisch untersucht. Um zu prüfen, wie die Temperatur den Ultraschallaufschluß beeinflusst, untersuchten wir Zellen bei Temperaturen von + 20 bis - 20°C. Es war nicht möglich, die Temperatur höher als 20° ansteigen zu lassen, da dann der Anteil der thermischen Inaktivierung der ADH zu groß geworden wäre. Auch konnten wir nicht tiefer als - 20° gehen, da die Zellsuspensionen sonst zu leicht einfroren oder zu hohe Gefrierpunktserniedrigende Lösungsmittelzusätze notwendig waren. Um den Gefrierpunkt unserer Hefezellsuspension herabzusetzen, wählten wir zunächst einen Zusatz von 10 bis 30%igem Glycerin.

Versuchsreihe 7

Versuch	Temp. in C	Lösungsmittel	Aufgeschlossene Zellen (Zellzahl in %)
1	20°	Trap	40,1
2	10°	Trap	45,5
3	0°	Trap	50,6
4	0°	90%Trap, 10 % Glycerin	39,6
5	-10°	90%Trap, 10 % Glycerin	30,3
6	-20°	70%Trap, 30 % Glycerin	25,3

Anmerkung:

5 g ad 100 ml des jeweiligen Lösungsmittels.

Aus der Zusammenstellung ist zu ersehen, daß Glycerinzusatz den Aufschluß der Zellen wesentlich verschlechtern. Günstiger verhält sich Aceton als Zusatz, um den Gefrierpunkt zu erniedrigen. Es bewirkt eine geringgradige Steigerung des Zellaufschlusses.

Versuchsreihe 8

Ver- such	Temp. in C.	Lösg.- mittel	aufge- schlos- sene Zell. in %	Pro- tein mg/ml	Pro- tein in %	ADH in M/min.ml	ADH in %	spez.Akt. M/min.mg Protein
1	20°	Trap	46,8	2,33	100,9	0,65	53,4	0,282
3	20°	"	37,7	2,32	100,7	0,86	77,2	0,372
5	0°	"	47,9	2,29	100,0	1,12	100,0	0,490
7	0°	5%Aceton 95%Trap	52,7	2,58	106,3	1,57	126,4	0,477
9	-5°	"	44,5	2,37	101,8	1,77	157,3	0,76
11	-5°	10%Aceton 90%Trap	43,8	2,12	92,9	1,36	120,6	0,64
13	-10°	"	39,9	2,08	90,8	2,04	177,4	0,96

Versuchsreihe 11

Ver- such	Temp. in C.	Lösg.- mittel	Prot.- geh.mg/ml	Pro- tein in %	ADH in M/min.ml	ADH in %	spez.Akt. M/min.mg Protein
1	0°	Trap	1,77	100	1,29	100	0,775
3	0°	5%Aceton 95%Trap	2,41	136	1,95	153	0,645
5	-5°	"	2,20	124	1,68	134	0,765
7	-10°	10%Aceton 90%Trap	2,18	123	1,65	127,6	0,760
9	-20°	20%Aceton 80%Trap	1,85	104	1,89	145	1,03

Anmerkung:

Die Prozentualen Angaben der Protein- und Enzymausbeute sind in Versuchsreihe 8 auf Versuch 5, in Versuchsreihe 11 auf Versuch 1 bezogen. Die Zahlenangaben sind Mittelwerte zweier Doppelbestimmungen.

Es fällt auf, daß bei 0°C und Acetonzusatz zum Lösungsmittel die meisten Zellen aufgeschlossen werden und am meisten Protein aus den Zellen austritt. Der Proteingehalt sinkt bei tieferen Temperaturen ab. Die Enzymaktivität ist bei hohen Temperaturen niedriger, bleibt bei tieferen Temperaturen aber im Bereich des Fehlers gleich. Die oben erwähnte niedrigere Protein- und gleichbleibende Enzymausbeute im tiefen Bereich ließ die spez. Aktivität ansteigen.

4. Zeitabhängigkeit des Ultraschallaufschlusses.

Davies erkannte, daß der Grad des Zellaufschlusses eine negative Exponentialfunktion der Zeit ist. Auch Pohlmann (13) fand bei *Cyclops albidus* exponentiale Letalitätskurven nach Beschallen. Er konnte mit seinen Versuchen weiterhin beweisen, daß bei der Beschallung der Intensität eine weitaus größere Bedeutung zuzumessen ist als der Zeit, also daß das z. B. beim Röntgen gültige Intensität-mal-Zeitgesetz ($I \times t = \text{konstant}$) beim Ultraschall nicht gilt. Gleichzeitig muß aber bemerkt werden, daß Pohlmann bei anderen Versuchstieren andere Gesetzmäßigkeiten fand und zwar Abtötung nach dem "Alles-oder-Nichtsgesetz". Hübener konnte feststellen, daß *Streptomyces hydrogenans* nach etwa 1 min., Hefezellen nach 2 bis 3 min. aufgeschlossen sind, wobei sich Cytoplasma- und Strukturelemente der Zellen unterschiedlich verhalten. - Wir fanden die bisherigen Ergebnisse bestätigt. Nur sei zu diesen wie auch zu allen anderen Ergebnissen bemerkt, daß wir verschiedene Hefekulturen benutzten und fanden, daß Aufschließbarkeit, Protein- und Enzymgehalt verschiedener Hefechargen ziemlich differieren können. Auch das Alter der Hefezellen spielt eine Rolle. (Vergleiche Befunde über unterschiedliche Zerstörbarkeit von Tuberkelbazillen (25)).

5. Leitfähigkeitsänderung nach Beschallen.

Von Grabar und Prudhomme (9, 10, 11) wurde angegeben, daß nach Beschallen die Leitfähigkeit der beschallten Lösung zunimmt. Da Schwermetallionen Enzyme sehr empfindlich vergiften können und da die Beschallungsgefäße und der Stempel aus Metall hergestellt waren, mußte geprüft werden, ob die Metallteile bei der Beschallung Ionen abgeben. Wir mußten also die Leitfähigkeit der Flüssigkeit vor und nach Beschallen feststellen. Da die Menge der abgegebenen Ionen zu gering war, konnten wir sie chemisch nicht fassen. - Es wurde ein Leitfähigkeitsmeßgerät der Type LBR (Hersteller: Wissenschaftl.-Techn. Werkstätten in Weilheim Obb.) benutzt, das nach dem Prinzip der Wheatstoneschen Brücke arbeitet. *

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Leitfähigkeit von CO₂-freien Wasser bestimmt. Dasselbe Wasser wurde mit Luft geschüttelt und wieder die Leitfähigkeit festgestellt. Schließlich wurde das Wasser beschallt und nochmals die Leitfähigkeit geprüft. In einer zweiten Versuchsreihe wurde dem Wasser KCl definierter Molarität zugegeben, um herauszufinden, welche Ionenzunahme der gemessenen Leitfähigkeitszunahme entspricht.

Versuchsreihe 5 A

Versuch	1. Messung (CO ₂ -freies H ₂ O)	2. Messung (nach Schütteln)	3. Messung (nach Beschallen)	4. ΔZ.B.
1	3,36.10 ⁻⁶	10,60.10 ⁻⁶	24,5.10 ⁻⁶	13,90.10 ⁻⁶
2	3,82.10 ⁻⁶	8,40.10 ⁻⁶	22,2.10 ⁻⁶	13,80.10 ⁻⁶
3	3,59.10 ⁻⁶	7,21.10 ⁻⁶	20,8.10 ⁻⁶	13,59.10 ⁻⁶
4	4,54.10 ⁻⁶	7,08.10 ⁻⁶	19,9.10 ⁻⁶	12,82.10 ⁻⁶
5	4,55.10 ⁻⁶	7,41.10 ⁻⁶	24,0.10 ⁻⁶	16,54.10 ⁻⁶
6	3,68.10 ⁻⁶	8,18.10 ⁻⁶	23,6.10 ⁻⁶	14,42.10 ⁻⁶

*) Für die freundliche Überlassung des Gerätes danken wir Herrn Doz. Dr. Zahn.

Versuchsreihe 5 B

Ver- such	1.Messung (CO ₂ -frei- es H ₂ O)	2.Messung (nach Schütteln)	3.Messung (nach Zuga- be von KCl)	Molarität des KCl	4. ΔZ.KCl
1	3,37.10 ⁻⁶	5,70.10 ⁻⁶	63,2.10 ⁻⁶		57,5.10 ⁻⁶
2	3,63.10 ⁻⁶	5,91.10 ⁻⁶	58,2.10 ⁻⁶	6,6.10 ⁻⁵ m	52,3.10 ⁻⁶
3	3,51.10 ⁻⁶	5,74.10 ⁻⁶	24,9.10 ⁻⁶		19,2.10 ⁻⁶
4	3,65.10 ⁻⁶	5,49.10 ⁻⁶	24,4.10 ⁻⁶	3,3.10 ⁻⁵ m	18,5.10 ⁻⁶
5	3,92.10 ⁻⁶	5,99.10 ⁻⁶	20,0.10 ⁻⁶		14,01.10 ⁻⁶
6	3,42.10 ⁻⁶	5,40.10 ⁻⁶	19,2.10 ⁻⁶	2,2.10 ⁻⁵ m	13,80.10 ⁻⁶
7	3,88.10 ⁻⁶	5,81.10 ⁻⁶	15,4.10 ⁻⁶		9,59.10 ⁻⁶
8	3,65.10 ⁻⁶	5,41.10 ⁻⁶	13,9.10 ⁻⁶	1,6.10 ⁻⁵ m	7,69.10 ⁻⁶

Anmerkung:

ΔZ.B.Δbzw. KCl bedeuten die Differenzwerte zwischen 2. und 3. Messung, also die tatsächliche Leitfähigkeitszunahme durch Beschallen bzw. durch Zugabe von KCl.

Es tritt also eine nur geringfügige Ionenzunahme, nämlich 2,2.10⁻⁵ bis 2,8.10⁻⁵n, durch Beschallen auf. Wir verwendeten einen Zusatz von Titriplex (Äthylendiamintetra-essigsäure), um auch diese geringe Ionenzunahme abzufangen. Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, genügte eine etwa 3,3.10⁻⁵n Titriplexlösung. Wir benutzten jedoch 2,2.10⁻²n Titriplexlösung, um mit Sicherheit keine Vergiftung der Enzyme durch Metallionen zu erhalten.

6. Weitere Verwendungsmöglichkeiten des Ultraschalls.

Violle (19) konnte Pertussis-Erreger in wässriger Lösung durch Beschallen bei 960 kHz zerstören. Wir beschallten eine Pertussis-Erregerlösung bei 20 kHz und konnten nach Zentrifugieren im Überstand Protein nachweisen und damit die Befunde von Violle für einen anderen Frequenzbereich bestätigen.

Die dispergierende und kolloidchemische Wirkung des Ultraschalls (7,8) ist schon seit langer Zeit bekannt und so gut erforscht, daß hierüber nur wenig hinzuzufügen bleibt. Für unsere speziellen Zwecke war es wichtig, eine stabile Suspension von Cortisol, die sonst sehr schwer herzustellen ist, mit Hilfe von Ultraschall innerhalb kurzer Zeit zu erhalten. Es wurden 100 mg Cortisol in 20 ml physiologischer NaCl suspendiert und diese Lösung etwa 6 min. beschallt.

B. Diskussion der Ergebnisse.

Da unsere Versuche zum großen Teil der Suche nach den günstigsten Bedingungen für Enzymaufbereitung bei präparativem Arbeiten im Durchlauf galten, sei auch bei der Diskussion das Hauptaugenmerk auf die Änderung der spezifischen Aktivität unter dem Einfluß der Temperatur-, Konzentrations- und Zeitänderung gerichtet. Wir fanden, daß bei steigender Temperatur und zunehmender Beschallungszeit die spez. Aktivität abfällt. Hierfür wird von einigen Autoren thermische Inaktivierung, von anderen chemische oder mechanische Inaktivierung verantwortlich gemacht. Thieme (20) hat die Einwirkung von Ultraschall auf Gelatine, Gummi arabicum und Agar-Agar untersucht und fand die Zähigkeit dieser Lösungen nach Beschallung herabgesetzt. Diese Wirkung steigt mit dem Molekulargewicht an und ist konzentrationsabhängig. Schmidt (21) kommt auf Grund einer Vielzahl von Versuchen zu folgender Deutung der Ultraschalldepolymerisation. Die Zerstörung der Makromoleküle kommt durch Reibungskräfte zwischen der im Ultraschallfeld hin- und herschwingenden Flüssigkeit und den trägen Makromolekülen, die den raschen Schwingungen nicht mehr ganz folgen können, zustande. Es tritt nämlich in einem gewissen Konzentrationsbereich gegenseitige Vernetzung der Moleküle auf, ihre trägen Massen addieren sich, und der ganze Molekülkomplex schwingt nicht mehr mit dem Lösungsmittel mit. Das Lösungsmittel schwingt dann in den Lücken der Molekülnetze, so daß es dadurch zu einer

Relativbewegung zwischen Lösungsmittel und Molekülen kommt, wodurch Reibungskräfte entstehen. Diese Kräfte sind tatsächlich, wie rechnerisch festgestellt, von solcher Größe, daß sie eine C-N-Bindung spalten können. Falls diese Überlegung richtig ist, muß die Depolymerisation umso größer sein, je größer die Moleküloberfläche im Vergleich zu den Bindungskräften ist. In der Tat ist auch die Spaltung von Fadenmolekülen im Ultraschallfeld am weitaus größten. Nach Schmid (22) wird die Kinetik des Abbauvorganges durch

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot N_L (P - P_e)$$

dargestellt, wobei $\frac{dx}{dt}$ die Abbaugeschwindigkeit, P den Polymerisationsgrad zur Zeit t, P_e den Endpolymerisationsgrad, N_L die Loschmidtsche Zahl und k eine Konstante bedeuten. Weiterhin war die Frage zu klären, ob die Trägheit oder die Steifheit der Moleküle für das Zerbrechen verantwortlich ist; da die Depolymerisationswirkung des Ultraschalls auch bei Molekülen auftritt, die dieselbe Dichte wie das Lösungsmittel haben, ist ersichtlich, daß die Steifheit der Moleküle für den Abbau verantwortlich ist. Es konnte auch gezeigt werden, daß der Depolymerisationseffekt des Ultraschalls bei steigender Temperatur abnimmt; dieser Effekt ist deshalb nicht meßbar, weil er sich von der thermischen Inaktivierung der Enzyme nicht unterscheiden läßt. Die Konzentrationsabhängigkeit der Ultraschalldepolymerisierung wurde von Schmid und Rommel (23) untersucht. Sie fanden, daß der Abbau der Makromoleküle bei niedrigen und hohen Konzentrationen gering, im mittleren Bereich aber am höchsten ist. Sie nahmen an, daß sich die Relativbewegungen nur im mittleren Konzentrationsbereich auswirken können, während bei niedriger Konzentration die Moleküle noch frei beweglich sind und bei hoher das Lösungsmittel so fest an das Molekülnetz gebunden ist, daß es nicht mehr zu selbständigen Schwingungen fähig ist. Im gesamten gesehen ist die Depolymerisationsrate des Ultraschalls ziemlich gering, und zwar beträgt sie $4 \cdot 10^{-7}$; pro Schwingung werden also von

10^7 nur etwa 4 Moleküle zerstört. - Unsere Ergebnisse lassen sich unschwer in diese Theorien einordnen. In tiefem Temperaturbereich ist die thermische Inaktivierung des Enzyms am geringsten, die spezifische Aktivität also am höchsten. Bei längerer Beschallung werden mehr Moleküle der ADH zerstört, obwohl diese ein Sphäroprotein (Verhältnis der Radien 1 : 1,27) darstellt. Außerdem kommt hinzu, daß dieses Enzym cytoplasmatisch ist (1), also schnell in Lösung geht und durch die später aufgeschlossenen Struktureiweiße verdünnt wird. Die Höhe der spez. Aktivität bei niedrigen und hohen Konzentrationen läßt sich ebenfalls ohne Schwierigkeiten in die Theorie über das Maximum der Makromolekülzerstörung im mittleren Konzentrationsbereich der Lösung (20 - 30 g / 100 ml) einfügen. Die geringere Aufschlußrate der Hefezellen bei Zusatz von Glycerin bzw. die verbesserte bei Zusatz von Aceton zum Lösungsmittel können durch die Verminderung bzw. Vergrößerung der Relativbewegungen zwischen Zellen und Lösungsmittel erklärt werden. Ebenso könnte die geringere Proteinausbeute im tieferen Temperaturbereich durch Zunahme der Viskosität des Lösungsmittels zustande kommen. Das gehäufte Auftreten der sogenannten "ghosts" bei höheren Temperaturen schreiben wir der größeren Elastizität der Zellmembranen zu.

D Methodik.

Den beschallten Suspensionen wurden Proben für Zählungen im Phasenkontrastmikroskop und im EEL (Automatische elektronische Zählmethode) entnommen. Der Rest der beschallten Suspension wurde bei 5000 Umdrehungen und 0°C zentrifugiert. Im Überstand wurde dann der Proteingehalt der Lösung sowie die Aktivität der ADH mit dem optischen Test bestimmt.

1. Zellzählung.

a. im Phasenkontrastmikroskop.

In einer Thomazählkammer wurden die Zellen der Suspensionen vor und nach der Beschallung als Maß für den Zellaufschluß ausgezählt. Es mußte allerdings darauf geachtet werden, daß sich manche Zellen weitaus lichtschwächer darstellten und, wie schon erwähnt, nur als Zellmembranen ohne Zellinhalt (ghosts) vorlagen. Diese Zellhüllen wurden nicht mitgezählt.

b. Im EEL.

In einem von der Firma Evans, Elektroselenium Limited, konstruierten sogenannten EEL-Blutkörperchenzählautomaten konnten wir durch die freundliche Hilfe von Herrn Dr. Damming unsere Hefezellsuspensionen auszählen. - Die Zellen werden im Dunkelfeld dargestellt. Eine Pumpanlage preßt eine definierte Flüssigkeitsmenge, die vorher gut durchmischt wurde, durch eine enge Düse. Der hierbei entstehende Lichtstrahl wird durch ein Mikroskop beobachtet. Die Optik des Mikroskopes entwirft ein reelles vergrößertes Bild der Teilchen auf dem Schlitz eines Photomultipliers (Elektronischer Lichtverstärker). Durch entsprechende Wahl der Vergrößerung der Dimension des Schlitzes kann jeder Durchtritt eines Teilchens infolge des entstehenden Lichtimpulses elektronisch mit einem Dekadensystem gezählt werden. In einer weiteren Bearbeitung der elektronischen Zählmethode werden die mit dem Photomultiplier gelieferten Impulse analysiert. Die Zellgröße zeigte sich diesen proportional. Die Impulse werden in einem RCL-256-Kanalimpulshöhenanalysator gezählt. Man kann mit diesem Gerät die Größenverteilung von etwa 80.000 Zellen in einer Minute bestimmen.

2. Optische Tests.

a. Proteinbestimmung.

1 ml Ultraschall-extrakt wurde mit einem ml 10%iger HClO_4 versetzt und zentrifugiert, das Sediment in 4 ml eines organischen Lösungsmittels (2 Teile Äther, je 1 Teil Aceton und Äthanol) gelöst und wiederum zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2,5 ml aqua bidest. und 2,5 ml Biuret-reagenz gelöst und die Extinktion nach einer halben Stunde im Eppendorffphotometer bei 540 nm abgelesen. Hieraus konnte dann der Proteingehalt errechnet werden.

b. Enzymbestimmung

In ein Gemisch von 1,3 ml Hydrazinpuffer, 0,03 ml DPN (20 mg/ml) und 0,02 Äthanol (p.a. Merck) wird ein Aliquot (0,01 - 0,1) des Ultraschall-extraktes eingebracht. Die nun auftretende Extinktionszunahme wird gemessen und auf 1 ml Enzym umgerechnet. Die Werte werden in E/min. ml ausgedrückt. Der Test wurde bei etwa 25°C durchgeführt.

Die spezifische Aktivität ist die Enzymaktivität pro mg Protein der untersuchten Lösung ($\mu\text{E/min. mg}$).

3. Beschreibung der Apparatur.

Das für die Beschallung benutzte Ultraschallgerät * ist folgendermaßen aufgebaut (Abb. 10): Ein aus lamellierten Blechen bestehender Nickelschwinger (a) wird in seiner Resonanzfrequenz von etwa 19,5 kHz erregt. Hierzu dient ein Hochfrequenzgenerator, der elektrische Schwingungen dieser Frequenz erzeugt. Diese Schwingungen werden dann von dem Nickelschwinger als elektromechanischen Wandler in mechanische Längsschwingungen der beiden Stirnflächen (b1, b2) umgewandelt. An einer dieser Flächen (b1) ist ein Luftpolster (c) angebracht, damit die daran totalreflektierte mechanische Schwingung phasenrichtig aus der

*) Firma Schoeller & Co., Bfm.-Lud

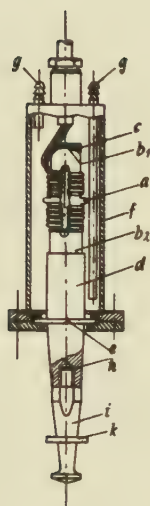


Abb. 10

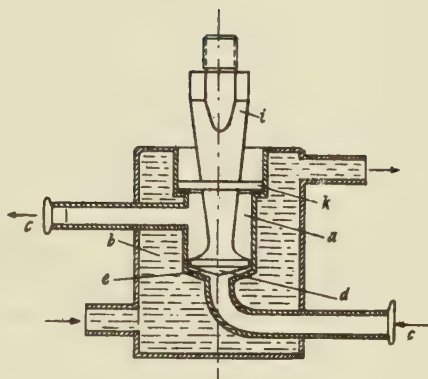


Abb. 11

Abb. 10. Aufbau des Koppelschwingers. a Magnetostriktiver Nickelschwinger; b Stirnflächen des Nickelschwingers; c Luftpolster; d Metallzylinder, der die Schallwellen überträgt; e Schwingungsknotenebene von d mit Flansch, an dem das Gerät gehalten ist; f Metallgehäuse, das mit Leitungswasser durchströmt wird; g Stutzen zum Anschluß an Leitungswasser; h Gewinde zum Anschrauben des Stempels (i); i Stempel, von dessen unteren sich verbreiternden Teil der Schall in die Zellsuspension abgestrahlt wird; k Schwingungsknotenebene des Stempels (i)

Abb. 11. Schematische Darstellung des Durchlaufgefäßes. a Zylindrischer Hohlraum; b Kühlmantel mit Stutzen zum Anschließen an Kältethermostat; c Stutzen zum Einführen der Lösung; d Schallabstrahlende Fläche; e Intensivste Beschallungszone; i Metallstempel; k Schwingungsknotenebene des Stempels (i)

anderen Stirnfläche (b2) mit heraustritt. Bei dieser einseitigen Abstrahlung erhält man demzufolge eine Vergrößerung der Schwingungsenergie.

An die Schallabstrahlungsfläche (b2) ist der Metallzylinder (d) angeschweißt, dessen mechanische Längsschwingung die gleiche Resonanzfrequenz hat wie der Nickelschwinger (a) und der in seiner Schwingungsknoten-Ebene einen breiten Flansch besitzt. Hier wird das gesamte in der Abb. 10 dargestellte System gehalten, wobei gleichzeitig über diesen Flansch ein dünnes Metallgehäuse (f) angebracht ist. Somit kann der Nickelschwinger mit Leitungswasser gekühlt werden (g)

Der Metallzylinder (d) dient zur Übertragung der vom Nickelpaket erzeugten Schallenergie. Seine untere Fläche hat die Gestalt eines sich nach unten verjüngenden Kegelstumpfes, in dem ein Gewinde (h) eingeschnitten ist. Hier wird ein metallischer Stempel (i) hineingeschraubt. Der Stempel ist auf die gleiche Resonanzfrequenz abgestimmt. Die Schallenergie wird also vom Nickelschwinger (a) über den Metallzylinder (d) und den Stempel (i) ausgekoppelt, weshalb man die gesamte Anordnung Koppelschwinger nennt.

Das wesentliche Merkmal hierbei ist, daß die schallübertragenden Metallteile (d und i) sich nach unten verjüngen und daß die schallübertragende Fläche wieder aus einer Verbreiterung besteht. Hierdurch erreichte man eine bedeutende Verstärkung der pro cm^2 abgestrahlten Schallenergie. - Führt man dem Nickelschwinger eine Hochfrequenzleistung von 500 bis 600 Watt zu, so gehen vom verbreiterten unteren Ende des Stempels mechanische Schwingungen - bei etwa 19,5 kHz - mit einer Energiedichte von 40 bis 50 Watt pro cm^2 nach unten und teilweise auch nach oben aus.

Der Stempel (i) hat seine eigene Schwingungsknotenebene (k). An dieser Stelle befindet sich ebenfalls ein breiter Flansch,

an dem das metallische Durchlaufgefäß (Abb. 11) befestigt ist. Dieses besteht aus einem zylindrischen Hohlraum (a) und einem darumliegenden Kühlmantel. In den Hohlraum (a) ragt das verbreiterte schallabstrahlende Ende des Stempels hinein, und hier findet die Beschallung der Zellsuspension statt. Diese fließt von unten her (c) gegen die schallabstrahlende Fläche (d) des Stempels (i) in den Hohlraum (a) ein und läuft dann in geringer Schichtdicke durch die sehr intensive spaltförmige Beschallungszone (e). Die nach oben gerichtete Schallabstrahlung des schwingenden verbreiterten Stempelendes ist ebenfalls sehr kräftig. Durch sie wird ein zusätzlicher Anteil der Zellen aufgeschlossen. - Wir benutzten das Durchlaufgefäß auch zum Testen im Stand, in dem wir 15 ml der Suspension in den Beschallungsraum einfüllten, Zufluß- und Abflußstutzen verschlossen und dann beschallten. - Die außerordentlich hohe Energiedichte würde ohne Kühlung zu einer starken Erwärmung der beschallten Flüssigkeit führen. Deshalb ist der Beschallungsraum von einem Kühlmantel (b) umgeben, durch den Leitungswasser oder besser eine Kältesole fließen kann.

4. Handhabung der Apparatur.

Von gepreßter Hefe * wurde eine gleichmäßige Zellsuspension in Trap (pH 7,6, 0,05 m, Versen $2,2 \cdot 10^{-2}n$) hergestellt. Hierzu wurden Hefezellen in Trap eingewogen und mit einem Kugelstab in einem Meßzylinder vermischt. Um auf jeden Fall eine Enzymschädigung durch Temperaturanstieg zu vermeiden, kühlten wir das Beschallungsgefäß mit 40%igem Äthanol als Kältesole so tief, daß die Suspension gerade nicht einfrore. Bei der Entnahme aus dem Beschallungsgefäß betrug die Temperatur der Flüssigkeit etwa + 3 bis - 1°C. Wenn nicht anders vermerkt, beschallten wir 3 min. bei einer Frequenz von 19,5 kHz. - Zwischen den verschiedenen Proben der Zellsuspensionen wurde das Beschallungsgefäß mit Trap gefüllt und kurz beschallt, um eine vollkommene Reinigung zu erzielen.

*) Firma Pleser, Darmstadt; Firma Hefe-Weber, Ffm.

E. Zusammenfassung.

Es wird eine Ultraschallapparatur beschrieben, durch die Zellen im Durchfluß bei hoher Leistungsdichte aufgeschlossen werden. Die Apparatur arbeitet mit einem magnetostriktiven Nickelschwinger, wobei die Schallenergie durch einen Koppelschwinger verstärkt wird.

Es wurden vorwiegend Hefezellen als Modell für die Untersuchungen über die Wirkungsweise des Ultraschalls verwendet. Wieviel Zellen aufgeschossen wurden, stellten wir dadurch fest, daß wir Teile der Zellsuspension vor und nach dem Beschallen im Phasenkontrastmikroskop auszählten. Ihre Größenverteilung ermittelten wir mit einer elektronischen Zählmethode. Die beschallte Zellsuspension wurde danach zentrifugiert und im Überstand der Proteingehalt und die Aktivität der Alkoholdehydrogenase bestimmt. -

An Hand dieser Verfahren wurde untersucht, wie die Konzentration der Zellsuspension, die Temperatur, die Beschallungszeit und die Spaltbreite den Zellaufschluß beeinflussen. Weiterhin wurde geprüft, ob Metallionen von der Apparatur an die beschallte Zellsuspension abgegeben werden.

F. Literatur.

- (1) Hübener, H. J., Biochem. Zeitschrift Bd. 331 (1959)
- (2) Davies, R., Biochim.-biophys. Acta Bd. 33 (1959)
- (3) Schmitt, F. O. u. Uhlemeyer, Proc.Soc.exp.Biolog.
Med. Bd. 27 (1930)
- (4) Johnson, C. H., J. Physiology Bd. 67 (1930)
- (5) Rayleigh, Lord, Phil. Mag. (6) Bd. 34 (1917)
- (6) Harvey, E. N., J. Am. Chem. Soc. Bd. 51 (1945)
- (7) Richards, W. T., J. Am. Chem. Soc. Bd. 51 (1929)
- (8) Claus, B. u. E. Schmidt, Kolloid-Beihefte, Bd.45 (1936)
- (9) Grabar, P. u. R. Prudhomme, C. R. Acad. Sci., Paris
Bd. 226 (1947)
- (10) Grabar, P. u. R. Prudhomme, J. Chimie Physique,
Bd. 46 (1949)
- (11) Prudhomme, R. u. P. Grabar, Kongreßbericht in Erlangen
- (12) Stumpf, P. K., J. Bacteriolog., Bd. 51, (1946)
- (13) Pohlmann, R., Forschung u. Fortschritt, Bd. 15 (1939)
- (14) Pohlmann, R., Deutsche Med. Wschr., Bd. 65 (1939)
- (15) Shopshire, R. F., J. Bacteriolog. 53 (1947)
- (16) Whitney, R. u. Russell, Food Research 16 (1951)
- (17) Kinsloe, H., Ackermann u. Reid, J.Bacteriolog. 68 (1954)
- (18) Damminger, K. u. E. H. Graul, Atompraxis 4, Heft 10
(1958); Atompraxis 5, Heft 10/11 (1959)
- (19) Violle, M. H., C. R. Acad. Sci., Paris Bd. 237 (1948)
- (20) Thieme, E., Phys. Z., Bd. 39 (1938)
- (21) Schmid, G., Phys. Z., Bd. 41 (1940)
- (22) Schmid, G., Z. phys. Chem. Abt. A Bd 186
- (23) Schmid, G., O. Rommel, Z. phys. Chem. Abt. A Bd 85
- (24) Bergmann, L., Ultraschall
- (25) Laporte, R. u. J. Loiseleur, Ann. de l'Institute
Pasteur (1945)
- (26) Blake, F. G. jr., J. accoust. Soc. Amer., bd. 21 (1949)

Lebenslauf

Am 27. 4. 1937 wurde ich als Sohn des Dr. Karl Hayduk und seiner Ehefrau Maria, geborene Jäntsche, in Schluckenau, jetzt CSR, geboren. Ich verlebte meine Kindheit in Schluckenau und trat im Herbst 1943 in die dortige Volksschule ein. Von 1944 bis 1946 konnte ich, durch Kriegs- und Nachkriegswirren bedingt, keine Schule besuchen. Von 1947 bis Ostern 1949 wohnte ich dem Volksschulunterricht zunächst in Hirschhorn/Neckar und später in Nieder-Roden bei. Von Mai 1949 bis März 1957 besuchte ich die Rudolf-Koch-Schule in Offenbach, wo ich auch die Reifeprüfung bestand. Anschließend immatrikulierte ich mich zum Studium der Medizin an der Universität Frankfurt. Nachdem ich 5 Semester dort studiert hatte, legte ich im Sommer 1959 an dieser Universität die ärztliche Vorprüfung ab. Nach bestandener Vorprüfung verblieb ich noch ein Semester in Frankfurt und wechselte im Sommersemester 1960 zur Universität Wien.

Meine akademischen Lehrer waren:

Anatomie:	Prof. Dr. Starck Prof. Dr. Ortmann
Physiologie:	Prof. Dr. Wezler
Physiolog. Chemie:	Prof. Dr. Felix Privat-Doz. Dr. Hübener
Botanik:	Prof. Dr. Halbsguth
Zoologie:	Prof. Dr. Giersberg
Chemie:	Prof. Dr. Royen Prof. Dr. Wieland
Physik:	Prof. Dr. Czerny Prof. Dr. Rajewsky
Chirurgie:	Prof. Dr. Schönbauer Prof. Dr. Huber Prof. Dr. Ungeheuer Prof. Dr. Geißendörfer Prof. Dr. Chiari
Innere Medizin:	Prof. Dr. Fellingner Prof. Dr. Hittmair Prof. Dr. Hoff Prof. Dr. Lauda Prof. Dr. Halhuber
Kinder:	Prof. Dr. Kundratitz Prof. Dr. Asperger
Gynäkologie:	Prof. Dr. Antoine Prof. Dr. Tapfer Prof. Dr. Zacherl
Pathologie:	Prof. Dr. Kahlau Prof. Dr. Rotter
Hygiene:	Prof. Dr. Herzberg
Haut:	Prof. Dr. Herrmann
Pharmakologie:	Prof. Dr. Holtz
Neurologie:	Prof. Dr. Zutt Prof. Dr. Schwab
Gerichtsmedizin	Prof. Dr. Luff
Hals-Nasen-Ohren	Prof. Dr. Mittermeier Prof. Dr. Nowotny
Augen:	Prof. Dr. Thiel Prof. Dr. Heinz

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Enzymextraktion aus Zellen durch Ultraschall" im Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Privat-Doz. Dr. H.J. Hübener mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Zahn und Herrn Dr. Damminger ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 12. Februar 1963

Karl Hayduk

Karl Hayduk

